

**Etude comparative de l'activité
métabolique des mitochondries de
NEUROSPORA CRASSA
cultivé sur glucose ou sur acétate**

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade
de docteur ès sciences, mention biologie

par

Jean-Paul SCHWITZGUEBEL
de Genève

Texte condensé de la thèse N° 1766 approuvée par la Faculté des sciences.

Des copies en microfilms du texte complet peuvent être obtenues
auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de Genève.

Le texte complet peut être consulté à cette bibliothèque
ou à la Bibliothèque nationale suisse à Berne.

THÈSE N° 1766

Genève
Imprimerie Roulet
1976


**Etude comparative de l'activité
métabolique des mitochondries de
NEUROSPORA CRASSA
cultivé sur glucose ou sur acétate**

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade
de docteur ès sciences, mention biologie

par

Jean-Paul SCHWITZGUEBEL
de Genève

Texte condensé de la thèse N° 1766 approuvée par la Faculté des sciences.

Des copies en microfilms du texte complet peuvent être obtenues
auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de Genève.

Le texte complet peut être consulté à cette bibliothèque
ou à la Bibliothèque nationale suisse à Berne.

THÈSE N° 1766

Genève
Imprimerie Roulet
1976

La Faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs G. Turian, professeur ordinaire et directeur de thèse, J. Deshusses, professeur extraordinaire (dépt. de biochimie) et Mme F. Vanderhaeghe, chargée de cours (dépt. de biochimie), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 30 juillet 1976.

*Le doyen :
Jean Muller*

Thèse No 1766



Ce travail a été réalisé au Département de Biochimie. Il est dédié à la mémoire du Professeur Milos Kobr. L'enseignement, les conseils, mais aussi l'amitié de celui qui a conduit les premières étapes de cette thèse resteront vivants dans mon esprit longtemps encore.

Mes remerciements iront tout d'abord au docteur Francine Vanderhaeghe, qui a eu le courage, la patience et la persévérance de diriger la fin de ce travail. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier ensuite le professeur Gilbert Turian, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'être le directeur par intérim de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent également au docteur Jörg Stücki, de l'Institut de Pharmacologie de l'Université de Berne, et au professeur Jacques Deshusses, pour leurs conseils et critiques donnés avec sollicitude.

Je remercie enfin tous les collaborateurs du laboratoire qui m'ont apporté aide et conseils tout au long de mon travail.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. INTRODUCTION

L'adaptation de *Neurospora crassa* à l'acétate comme seule source de carbone et d'énergie se fait par la dérégulation des enzymes du cycle glyoxylique (Turian, 1961 ; Flavell et Fincham, 1968). Le fonctionnement de cette séquence anaplerotique suggère la possibilité d'une inhibition du cycle de Krebs (Turian, 1963) ; par conséquent, il y aurait antagonisme entre les deux voies métaboliques.

Pour Kornberg au contraire (1966), il y aurait une coopération entre les deux cycles afin de répondre aux exigences biosynthétiques et énergétiques de la cellule : le cycle glyoxylique permettrait le fonctionnement normal du cycle de Krebs malgré la gluconéogenèse.

Flavell et Fincham (1968) ont démontré que les enzymes du cycle de Krebs ne sont pas réprimés 6 heures après le transfert d'une culture saccharose en milieu acétate. En plus, l'activité spécifique de la NADP-isocitrate déshydrogénase est fortement augmentée par l'acétate (Kobr et al., 1965 ; Flavell et Fincham, 1968), suggérant une compétition entre deux des enzymes métabolisant l'isocitrate : isocitrate lyase et NADP-isocitrate déshydrogénase.

Par conséquent, le mécanisme contrôlant l'équilibre entre ces deux voies métaboliques ne peut être basé sur la seule répression ou dérégulation sélective d'enzymes. Il est donc vraisemblable que les propriétés cinétiques de ces derniers ainsi que leur répartition dans les différents compartiments intracellulaires contribuent largement à cette régulation. Les enzymes du cycle glyoxylique sont associés aux « microbodies », à l'exception de la citrate synthétase, uniquement localisée dans les mitochondries. Les microbodies sont donc dépendants d'une source extérieure d'isocitrate et ont été nommés « glyoxysome-like particles » ou GLP (Kobr et al., 1973).

Un certain nombre de questions se posent concernant le rôle du compartiment mitochondrial dans la régulation du métabolisme de l'acétate chez *Neurospora* :

- l'activité intégrée du cycle de Krebs est-elle affectée par l'acétate ?
- y a-t-il antagonisme, compétition ou coopération entre le cycle de Krebs et le cycle glyoxylique, entre les mitochondries et les GLP ?

But du travail

Le but de ce travail est de comparer les propriétés d'oxydation et de phosphorylation des mitochondries extraites de cultures sur acétate à celles de mitochondries de cultures sur saccharose.

De nombreuses publications font état de l'activité et de la régulation des enzymes pris individuellement (Flavell et Fincham, 1968), mais les résultats concernant le système intégré font défaut.

Or, le taux d'oxydation mitochondriale ne dépend pas seulement de la nature et de la concentration du substrat, mais également de sa pénétration à travers la membrane interne, de l'état redox des flavine et pyridine nucléotides et du couplage de la phosphorylation à la respiration.

Certes, les propriétés d'oxydation et de phosphorylation des mitochondries de *Neurospora* ont été étudiées par différents auteurs (Hall et Greenawalt, 1967 ; Weiss et al., 1970 ; Lambowitz et al., 1971) ; toutefois, les résultats obtenus ne concernent que des mitochondries extraites de cultures sur glucose ou saccharose.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) Souche utilisée

Neurospora crassa, type sauvage, FGSC 853 A.

2) Milieux de culture

- a) « Bacto-Neurospora minimal medium » (Difco Laboratories) avec 58 mM saccharose ou 110 mM acétate.
- b) Milieu N-minéral de Vogel (1956), mais sans citrate, avec 100 mM glucose ou 50 mM acétate.

3) Culture et récolte du mycélium

20 ml d'une suspension dense de conidies (3 O.D. à 550 nm) sont inoculés dans un flacon de 2 l. contenant 1,2 ou 1,5 l. de milieu liquide. Les flacons sont placés à 30° C sur agitateur rotatif jusqu'à l'obtention d'une culture en fin de croissance exponentielle. Le mycélium est récolté par filtration sur Büchner. Après rinçage par 3 l. d'eau distillée, il est essoré avec du papier-filtre et pesé (poids pressé).

4) Préparation de l'extrait mitochondrial

L'homogénéisation est basée sur une rupture physique ménagée du mycélium. 10 g de mycélium sont hâchés manuellement pendant 2 minutes avec un rouleau-hâchoir de cuisine à 5 lames, puis broyés dans un mortier durant 30 secondes dans un volume final de 50 ml du milieu de préparation mitochondriale décrit par Lambowitz et al. (1972).

L'homogénat est filtré sur 2 couches de gaze, puis centrifugé à 1000 x g pendant 10 minutes. Le surnageant résultant est centrifugé

à 20000 x g pendant 7 minutes pour les tests d'oxydation et de phosphorylation ou à 45000 x g pendant 12 minutes pour les essais d'incorporation de substrats radioactifs. Les culots sont remis en suspension avec une pipette à bout effilé (C-20 K) ou avec un piston en téflon (C-45 K) dans un volume final de 5 ml du milieu de respiration (=RM) décrit par Lambowitz et al. (1972) (3-4 mg protéine/ml).

5) Mesure de la consommation d'oxygène

Les mesures sont faites au moyen d'une électrode à oxygène, type de Clark (Yellow Springs Instrument, modèle 53). Une suspension de mitochondries contenant 1 à 2 mg de protéines est incubée à 30° C dans un volume final de 10 ml de RM saturé en air. Nous avons considéré que ce milieu contient la même quantité d'oxygène dissous qu'une solution de Ringer dans les mêmes conditions, soit 2,321 μ moles (Dixon, 1943). Les valeurs de contrôle respiratoire (RC) ont été calculées à partir de tracés polarographiques, selon Chance et Williams (1956) (figure 1).

6) Détermination du rapport P/O

Une fois la consommation d'oxygène mesurée, 2 ml de l'échantillon sont prélevés et mélangés rapidement à 0,35 ml d'acide perchlorique 40 % à 0° C. Les protéines précipitées sont éliminées par centrifugation. Le surnageant est neutralisé par l'addition de 5 N KOH ou de 4 N K₂CO₃. Le précipité de perchlorate est éliminé par centrifugation. L'ATP est dosé au moyen d'hexokinase et de glucose-6-phosphate déshydrogénase (Lamprecht et Trautschold, 1965). Le NADPH formé est mesuré dans un spectrofluorimètre, selon les conditions expérimentales décrites par Kobr et Turian (1967).

7) Dosage des protéines

Selon Lowry et al. (1951), avec un standard de « Bovine Serum Albumin » (Fraction V, Sigma) et un blanc de RM.

8) Incubation avec des substrats radioactifs

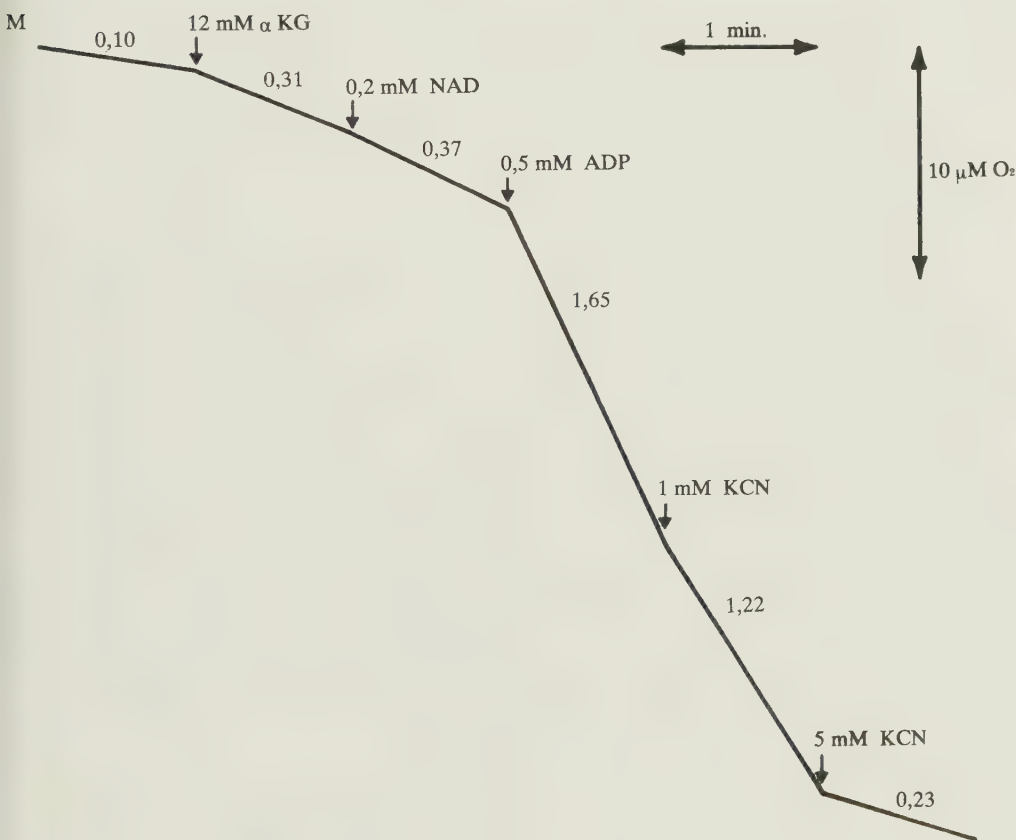
Les substrats suivants ont été utilisés (Radiochemical Centre, Amersham) : 2-céto 5 - ¹⁴C glutarate de sodium (8,12 mCi/mmole),

Figure 1

Mesure de la respiration par l'électrode à oxygène

(M = 2 mg de protéines mitochondriales)

Les nombres adjacents aux traces sont les taux de respiration exprimés en μ moles O_2 par heures et par mg de protéines.



L-U-¹⁴C acide malique (50 mCi/mmole), L-U-¹⁴C acide aspartique (10 mCi/mmole) et L-U-¹⁴C acide glutamique (10 mCi/mmole).

1-2 mg de protéines mitochondriales sont incubés dans un volume final de 2,5 ml de RM en présence de 1 μ Ci de substrat radioactif. Un barreau magnétique agite doucement le milieu pendant l'incubation à 30° C. Les réactions sont arrêtées par l'addition de 0,45 ml d'acide perchlorique 40 % à 0° C. Les protéines sont éliminées par centrifugation, puis le surnageant est amené à pH 6,0-6,5 par 5 N et 0,5 N KOH. Le précipité de perchlorate est éliminé par centrifugation, le surnageant étant analysé par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions.

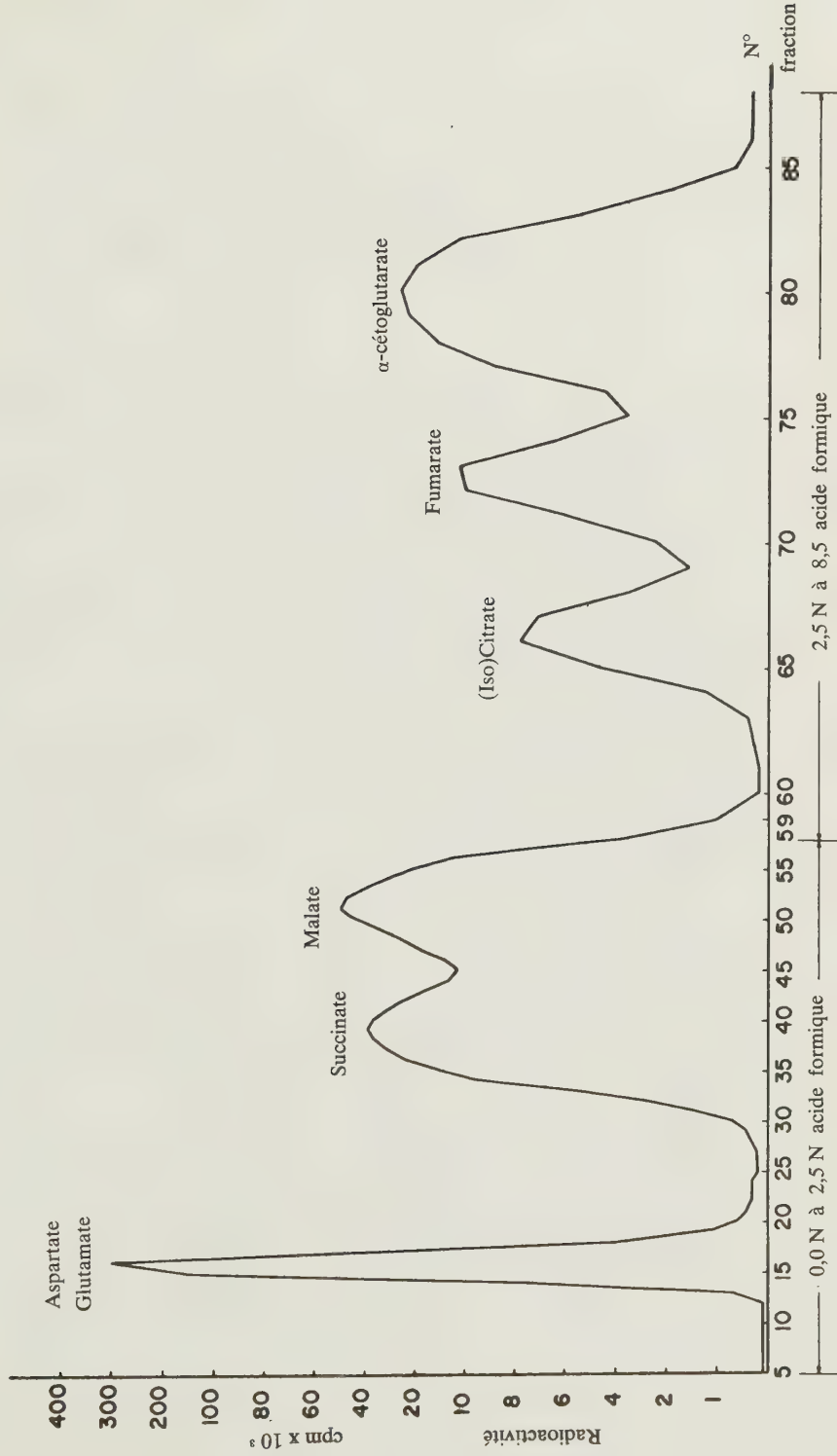
9) Séparation des intermédiaires du cycle de Krebs et de métabolites dérivés

Nous avons utilisé une modification de la méthode chromatographique décrite par Busch et al. (1952) ; au lieu d'un gradient d'élution exponentiel d'acide formique, nous avons utilisé deux gradients linéaires successifs.

L'échantillon est déposé au sommet d'une colonne Dowex 1-formiate X 10 200-400 mesh de 0,9 x 8 cm. Un premier gradient d'acide formique de 0 à 2,5 N est passé sur la colonne, 58 fractions de 1 ml étant recueillies. Puis la seconde partie de l'élution s'effectue au moyen d'un gradient de 2,5 à 8,5 N, 30 fractions de 2,5 ml étant alors recueillies. Dans les deux cas, la vitesse d'élution est de 1,5 ml à la minute. Les pics de radioactivité sont mis en évidence en mélangeant 0,5 ml de chaque fraction à 3,5 ml du mélange scintillant de Patterson et Greene (1965). L'émission de rayonnement bêta est mesurée dans un spectromètre à scintillation liquide Beckman LS-230. L'identification des métabolites dans les pics a été faite par : a) comparaison avec des substances de référence radioactives chromatographiées sur colonne Dowex (figure 2) ; b) analyse des pics par chromatographie sur papier ou sur couche mince et par électrophorèse à haute tension sur papier (travail fait par A. Rougemont).

Figure 2

Séparation de métabolites marqués en ^{14}C par chromatographie sur colonne échangeuse d'anions



III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

1) Comparaison entre des mitochondries de type saccharose et de type acétate

Les résultats concernant les propriétés d'oxydation et de phosphorylation des mitochondries extraites de cultures sur saccharose sont consignés dans le tableau 1. Ils montrent que :

a) Les mitochondries de *Neurospora* sont capables de respirer les différents intermédiaires du cycle de Krebs, et de coupler cette oxydation à la formation d'ATP. Les rapports P/O obtenus, bien qu'inférieurs aux valeurs théoriques, indiquent un fonctionnement raisonnable des différents sites de phosphorylation.

b) Les contrôles respiratoires observés oscillent entre 1,2 et 3,4. Ils sont donc nettement inférieurs aux valeurs mesurées avec des mitochondries d'origine animale, mais sont tout à fait comparables aux résultats obtenus par d'autres auteurs avec les mitochondries de *Neurospora*.

c) La consommation d'oxygène mesurée en présence d'ADP avec le citrate, l'isocitrate, l' α -cétoglutarate et le malate est du même ordre de grandeur (17 à 29 n atomes O/min/mg prot).

d) Le taux d'oxydation du succinate est beaucoup plus élevé que celui des autres intermédiaires du cycle de Krebs.

e) En l'absence de pyruvate, la respiration du malate diminue de moitié après quelques minutes d'incubation.

La comparaison des propriétés des mitochondries des deux types de cultures fait apparaître que :

a) La respiration de l'isocitrate est 2,5 fois plus forte dans les mitochondries de type acétate.

b) Les taux d'oxydation des autres substrats ne sont pas affectés.

**Tableau 1 : Oxydation et phosphorylation dans les mitochondries extraites de cultures
sur saccharose (S) et sur acétate (A)**

Substrat		Consommation d'oxygène (n atomes/min/mg prot)		Contrôle respiratoire	Rapport P/O
		Etat 4	Etat 3		
12 mM citrate (+ 3 mM malate)	S	19 ± 2 (5)	23 ± 1 (3)	1,2 ± 0,1 (3)	2,1 ± 0,4 (3)
	A	17 ± 2 (3)	23 ± 3 (3)	1,4 ± 0,2 (3)	2,3 ± 0,2 (3)
12 mM isocitrate	S	12 ± 2 (5)	17 ± 2 (4)	1,4 ± 0,2 (4)	1,7 ± 0,2 (3)
	A	30 ± 4 (6)	41 ± 5 (5)	1,4 ± 0,2 (4)	2,5 ± 0,4 (4)
12 mM α-cétoglutarate (+ 3 mM malate)	S	5 ± 1 (7)	17 ± 3 (4)	3,4 ± 0,4 (4)	3,7 ± 0,4 (4)
	A	5 ± 1 (6)	13 ± 3 (5)	2,5 ± 0,1 (5)	3,8 ± 0,3 (5)
12 mM succinate	S	76 ± 3 (6)	126 ± 12 (4)	1,7 ± 0,2 (4)	1,4 ± 0,2 (4)
	A	61 ± 8 (5)	106 ± 8 (5)	1,7 ± 0,2 (5)	1,4 ± 0,2 (4)
12 mM malate (3 mM pyruvate)	S	21 ± 2 (3)	29 ± 4 (3)	1,4 ± 0,2 (3)	Non déterminé
	A	14 ± 3 (4)	22 ± 4 (4)	1,6 ± 0,2 (4)	

Les valeurs sont données avec l'erreur standard à la moyenne.

Le chiffre entre parenthèses représente le nombre d'expériences effectuées.

Il apparaît ainsi que, dans les conditions de culture sur acétate, il n'y a pas d'antagonisme entre le cycle de Krebs et le cycle glyoxylique. Toutefois, la respiration de l'isocitrate est stimulée alors que la mitochondrie doit fournir ce métabolite au GLP ; cela ne permet donc pas de savoir s'il y a coopération ou compétition entre les deux organites pour le métabolisme de ce substrat.

2) Influence du L-malate sur les taux d'oxydation

Le tableau 1 montre aussi que certains substrats sont oxydés en présence de 3 mM L-malate, alors que d'autres sont bien respirés en l'absence de ce cofacteur. Etant donné le rôle du L-malate dans les systèmes de transport à travers la membrane interne des mitochondries d'origine animale (Chappell, 1969), nous avons comparé les taux d'oxydation des différents substrats avec et sans addition de ce métabolite. Les résultats sont présentés dans le tableau 2 :

a) La respiration du citrate et de l' α -cétoglutarate est stimulée par l'addition de malate.

b) Au contraire, l'addition de 3mM malate provoque une forte inhibition de la respiration de l'isocitrate et du succinate.

L'inhibition de la respiration du succinate par le malate peut s'expliquer partiellement au moins par la compétition existant entre ces deux anions dicarboxylates pour leur transport à travers la membrane interne. En plus, il est possible que le malate diminue l'activité de la succinate déshydrogénase de *Neurospora*, comme cela a été démontré pour l'enzyme isolé du foie de rat (Harris et Manger, 1968).

Les mitochondries d'origine animale possèdent un transporteur unique pour les anions tricarboxylates, dépendant d'un échange avec le malate et inhibé par le benzène 1,2,3-tricarboxylate (Robinson et al., 1971). Or, nous avons observé que le malate stimule la respiration du citrate et inhibe l'oxydation de l'isocitrate. De plus, il apparaît que :

a) L'addition de 3mM benzène 1,2,3-tricarboxylate diminue de 65 % le taux d'oxydation du citrate (+malate) et de 50 % la respiration de l'isocitrate.

**Tableau 2 : Influence du L-malate sur la respiration de différents substrats
(cas de mitochondries de type acétate)**

La consommation d'oxygène est exprimée en natomes 0/min/mg protéine.

Substrat	Sans malate		Avec 3 mM malate	
	Etat 4	Etat 3	Etat 4	Etat 3
Citrate	4 ± 1 (3)	8 ± 2 (3)	17 ± 3 (3)	23 ± 3 (3)
Isocitrate	30 ± 4 (6)	40 ± 5 (6)	4 ± 1 (3)	10 ± 1 (3)
α -cétoglutarate	4 ± 1 (10)	9 ± 2 (4)	5 ± 1 (7)	14 ± 3 (3)
Succinate	61 ± 8 (5)	106 ± 8 (5)	45 ± 5 (3)	73 ± 9 (3)

Les valeurs sont données avec l'erreur standard à la moyenne ; les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre d'expériences.

b) Nous avons également estimé le gonflement de la mitochondrie à la suite de la pénétration d'ions dans la matrice, en mesurant la diminution d'absorption à 520 nm dans un spectrophotomètre à double faisceau (Hunter et Smith, 1967). La diminution d'absorption est de 0,3 OD en présence de citrate (+malate) ou d'isocitrate seul. L'inhibition par 3mM benzène 1,2,3-tricarboxylate est la même que celle observée à l'oxygraphe.

c) Aucun effet direct du L-malate n'a pu être mis en évidence sur l'activité de la NAD- ou de la NADP-isocitrate déshydrogénase (Goldschmidt, communication personnelle).

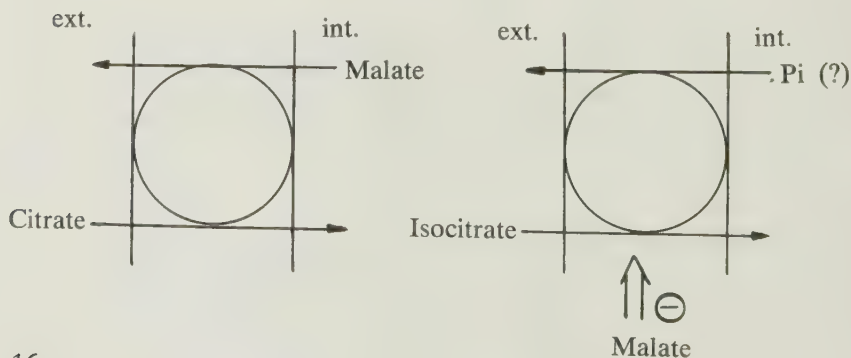
Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour tenter d'expliquer nos résultats :

a) Il y aurait un seul transporteur, avec une affinité pour le citrate accrue par 3 mM malate et une affinité pour l'isocitrate diminuée par ce métabolite, du moins à cette concentration.

b) L'isocitrate serait partiellement transporté par le système de transfert des anions dicarboxylates ; il y aurait ainsi une compétition entre le malate et l'isocitrate.

c) Il y aurait deux systèmes de transport distincts : l'un pour le citrate, dépendant du malate, un autre pour l'isocitrate, inhibé par le malate, et dépendant peut-être d'un échange avec le phosphate (schéma 1).

Schéma 1) Hypothèse de deux transporteurs



3) Influence de l'oxalacétate sur la respiration

A la fois substrat de la citrate synthétase, de l'aspartate aminotransférase et de la PEP-carboxykinase, l'oxalacétate occupe une position-clef entre le cycle de Krebs, le métabolisme des acides aminés et la gluconéogenèse. C'est pourquoi nous avons étudié l'influence de ce métabolite sur les taux d'oxydation des autres intermédiaires du cycle de Krebs (tableau 3).

Nous observons une forte inhibition de la respiration de tous les intermédiaires du cycle de Krebs testés. Pour les substrats dont l'oxydation dépend du NAD, cette inhibition disparaît progressivement après quelques minutes.

Une observation similaire a été reportée par Douce et Bonner (1972) avec des mitochondries isolées de plantes supérieures. Ces auteurs ont clairement démontré que l'inhibition est causée par la réduction de l'oxalacétate en malate, entraînant une compétition transitoire entre la malate déshydrogénase et la chaîne respiratoire pour oxyder le NADH (schéma 2). Il est probable qu'un tel phénomène ait lieu également dans les mitochondries de *Neurospora*.

L'inhibition de l'oxydation du succinate, peu réversible, pourrait s'expliquer par la fixation de l'oxalacétate sur le site catalytique ou un site allostérique de la succinate déshydrogénase, comme cela a été démontré avec l'enzyme isolé de tissus animaux (Ackrell et al., 1974).

D'autre part, le sort métabolique des quatre substrats et produits de l'aspartate aminotransférase a été étudié par l'emploi de traceurs radioactifs (tableau 4). Bien que les concentrations de substrats radioactifs soient trop faibles pour obtenir des résultats valables quantitativement, il apparaît qualitativement que l'activité de l'aspartate aminotransférase est réversible.

Nos résultats sont donc compatibles avec l'existence d'un complexe bi-enzymatique aspartate aminotransférase - malate déshydrogénase décrit par Munkres (1970). L'activité réversible de ce complexe bi-fonctionnel pourrait contrôler aussi bien le flux électronique dans la chaîne respiratoire que la distribution des squelettes carbonés entre le cycle de Krebs et les voies biosynthétiques.

Tableau 3 :
Influence de l'oxalacétate
sur les taux d'oxydation de divers substrats

Substrat oxydé	% d'inhibition par 0.4 mM oxalacétate
Citrate	55 $\pm$ 7 (3)
Isocitrate	84 $\pm$ 10 (3)
α -cétoglutarate	65 $\pm$ 8 (3)
Succinate	83 $\pm$ 11 (3)
Malate	70 $\pm$ 9 (3)

Schéma 2 : En présence d'oxalacétate

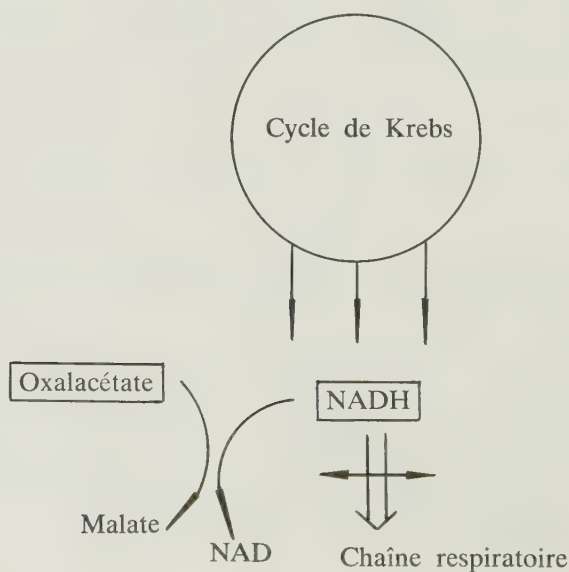


Tableau 4 : Incorporation des substrats de l'aspartate aminotransférase

Substrats	Consommation en 10 minutes		Répartition de la radioactivité en % du substrat consommé						
	% total	n moles/ mg prot	Citrate	α -Kg	Succinate	Fumarate	Malate	Glutamate	Aspartate
48 μ M ^{14}C α -Kg (12 mM Aspartate)	95	47	1	—	5	—	1	93	—
40 μ M ^{14}C Aspartate (12 mM α -Kg)	70	29	22	4	1	14	58	—	—
40 μ M ^{14}C Glutamate (4 mM Oxalacétate)	25	11	—	86	11	—	—	—	—
8 μ M ^{14}C Malate (4 mM Glutamate)	55	6	5	—	6	23	—	—	60

4) Respiration du NADH et du NADPH exogènes

Sa membrane interne étant imperméable au NAD(P)H, la mitochondrie ne peut pas oxyder le NAD(P)H exogène, à moins que la membrane ne soit détériorée. Toutefois, comme les autres auteurs ayant étudié les mitochondries de *Neurospora*, nous observons une forte respiration du NADH exogène et, dans une moindre mesure, du NADPH exogène (tableau 5). Il apparaît que :

a) L'oxydation du NAD(P)H exogène est couplée à la formation de 2 ATP seulement.

b) La consommation d'oxygène n'est que peu sensible à la roténone ; l'oxydation du NAD(P)H exogène semble donc avoir lieu en aval du premier site de phosphorylation.

c) L'oxalacétate n'a aucune influence sur l'oxydation du NADH.

Ces trois constatations nous permettent de penser que le NAD(P)H exogène ne peut pas être intégré au pool endogène et qu'il doit être oxydé à l'extérieur de la membrane interne, comme cela a été démontré pour les mitochondries de *Saccharomyces carlsbergensis* (von Jagow et Klingenberg, 1970). Une telle oxydation rapide du NADH exogène a également été observée avec les mitochondries isolées de végétaux supérieurs (Day et Wiskich, 1974).

Cette capacité d'oxyder du NAD(P)H exogène « in vitro » permet de penser que les mitochondries de *Neurospora* oxydent également le NAD(P)H produit ailleurs dans la cellule « in vivo » et couplent cette oxydation à la formation de 2 ATP.

5) Effet du NAD exogène sur les taux d'oxydation

Nous venons de voir que les mitochondries de *Neurospora* possèdent vraisemblablement deux voies distinctes pour oxyder le NADH exogène et le NADH endogène. Afin de mettre en évidence une éventuelle interaction entre les deux systèmes, nous avons tenté d'influencer les taux d'oxydation de divers métabolites par l'addition de NAD exogène (tableau 6) :

a) L'addition de NAD ne provoque qu'une faible augmentation de l'oxydation du citrate, mais seulement en présence de malate.

Tableau 5 : Respiration du NADH et du NADPH exogènes

	1 mM NADH	1 mM NADPH
Consommation O (état 4)	69 ± 6 (9)	33 ± 4 (6)
Consommation O (état 3)	164 ± 11 (7)	42 ± 4 (6)
Contrôle respiratoire	2,4 ± 0,2 (7)	1,3 ± 0,1 (6)
Rapport P/O	1,5 ± 0,2 (4)	1,6 ± 0,1 (6)
% inhibition par 1 mM KCN	94 ± 1 (11)	87 (1)
% inhibition par 50 µM roténone	13 ± 6 (6)	Non déterminé
% inhibition par 0,4 mM oxalacétate	0 (3)	Non déterminé

Les valeurs sont données avec l'erreur standard à la moyenne.
Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre d'essais.

b) Le NAD n'a aucun effet sur la respiration de l'isocitrate. Toutefois, l'inhibition causée par le malate est levée ou prévenue par le NAD.

c) La respiration du malate est stimulée par le NAD ; dans ces conditions, l'inhibition par $50 \mu\text{M}$ roténone passe de 31 % à 4 % seulement.

d) Le NAD exogène n'a que peu d'effet sur la respiration de l' α -cétoglutarate en état 4, mais stimule fortement la consommation d'oxygène en état 3 (Schwitzguébel et Kobr, 1974). Ainsi, le contrôle respiratoire apparent — environ 3 sans NAD — s'élève jusqu'à 5 en présence de NAD (tableau 7). Au contraire, l'efficacité de la phosphorylation est diminuée, le rapport P/O étant inférieur d'une unité en présence de NAD. Cette diminution est probablement due au court-circuitage du premier site de phosphorylation, puisque la sensibilité à la roténone est fortement abaissée par le NAD.

Etant donné l'imperméabilité de la membrane interne au NAD, il est peu probable que ce cofacteur influence directement l'activité de l' α -cétoglutarate déshydrogénase. L' α -cétoglutarate est probablement oxydé à l'intérieur de la membrane interne produisant du NADH oxydé normalement par la chaîne respiratoire. Toutefois, en état 3 et en présence de NAD, nous suggérons qu'un pouvoir réducteur issu de l'oxydation de l' α -cétoglutarate puisse traverser la membrane interne et réduire le NAD exogène. Le NADH ainsi produit serait réoxydé par la déshydrogénase située sur la face externe de la membrane interne (schéma 3). Selon cette hypothèse, les deux systèmes d'oxydation du NADH seraient capables d'interaction, peut-être par une transhydrogénase transmembranaire.

Un tel mécanisme a déjà été proposé pour l'oxydation du malate dans les mitochondries de bourgeon de chou-fleur (Day et Wiskich, 1974).

Tableau 6 : Influence du NAD sur la respiration de différents substrats (mitochondries de type acétate)

La consommation d'oxygène est exprimée en natomes O/min/mg protéine.

Substrat	Sans NAD		Avec 0.2 mM NAD	
	Etat 4	Etat 3	Etat 4	Etat 3
Citrate	4 ± 1 (3)	8 ± 2 (3)	4 ± 1 (4)	7 ± 1 (4)
Citrate (+ malate)	17 ± 3 (3)	23 ± 3 (3)	22 ± 3 (7)	31 ± 4 (5)
Isocitrate	30 ± 4 (6)	40 ± 5 (6)	30 ± 2 (12)	44 ± 5 (10)
Isocitrate (+ malate)	4 ± 1 (3)	10 ± 1 (3)	30 ± 2 (4)	50 ± 6 (4)
α-cétoglutarate	4 ± 1 (10)	9 ± 2 (4)	8 ± 1 (7)	37 ± 4 (5)
α-cétoglutarate (+ malate)	5 ± 1 (7)	16 ± 2 (5)	8 ± 1 (5)	41 ± 4 (5)
Malate	9 ± 1 (6)	12 ± 2 (6)	16 ± 2 (3)	22 ± 3 (3)
Malate (+ pyruvate)	14 ± 3 (4)	22 ± 4 (4)	18 ± 2 (3)	34 ± 3 (3)

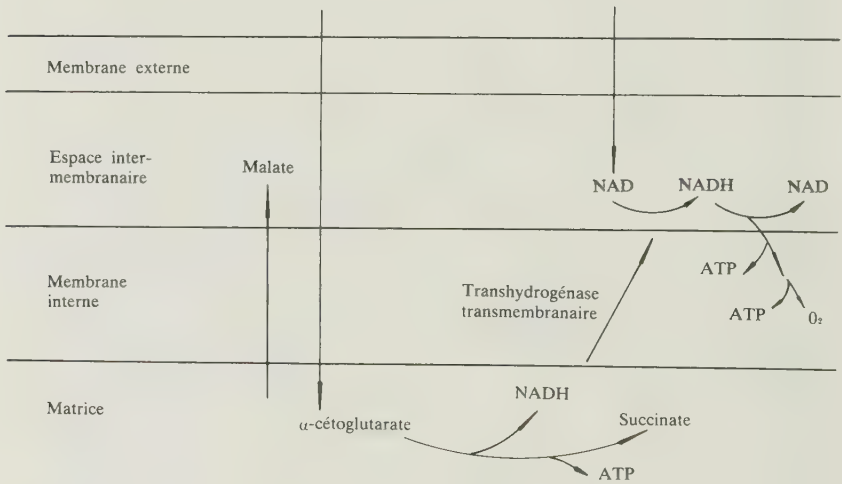
Les valeurs sont données avec l'erreur standard à la moyenne ; les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre d'expériences.

Tableau 7

Rôle du NAD sur la respiration de l' α -cétoglutarate

Conditions	RC	P/O	% inhibition par 50 μ M Rot.
12 mM α -Kg (3 mM Malate)	3,2 $\pm$ 0,3 (5)	3,8 $\pm$ 0,3 (5)	55 $\pm$ 10 (5)
12 mM α -Kg (3 mM Malate) 0,2 mM NAD	5,1 $\pm$ 0,5 (5)	2,5 $\pm$ 0,2 (5)	17 $\pm$ 5 (5)

Schéma 3 : Oxydation de l' α -cétoglutarate en présence de NAD



IV. CONCLUSIONS

Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'il n'y a pas d'antagonisme entre le cycle de Krebs et le cycle glyoxylique lorsque *Neurospora* est cultivé sur acétate.

Par contre, nos résultats ne permettent pas de décider s'il y a compétition ou coopération entre les deux voies métaboliques.

D'une part en effet, la localisation uniquement mitochondriale de la citrate synthétase rend les GLP dépendants des mitochondries pour leur fourniture en isocitrate. D'autre part, nous avons constaté une augmentation marquée de la respiration de l'isocitrate dans les mitochondries de type acétate. Nous avons attribué ce fait à l'activation de la NADP-isocitrate déshydrogénase et à sa grande affinité pour l'isocitrate.

Dès lors que les mitochondries doivent fournir de l'isocitrate aux GLP, la question se pose de savoir pourquoi leur capacité d'oxyder ce métabolite est plus forte dans les conditions de culture sur acétate. Deux hypothèses de travail peuvent être envisagées pour donner une réponse à cette question :

1) Il y aurait une *coopération* entre les deux voies métaboliques. Ce n'est pas l'isocitrate qui serait exporté par la mitochondrie, mais l' α -cétoglutarate (schéma 4). En effet, la production accrue de ce métabolite n'est pas accompagnée par l'augmentation de son oxydation intramitochondriale. L' α -cétoglutarate en excès serait ensuite réduit et carboxylé dans le cytosol et les GLP par la NADP-isocitrate déshydrogénase ; l'activité réversible de cet enzyme est possible (Kornberg, 1955), bien qu'elle n'ait pas encore été démontrée chez *Neurospora*.

2) Il y aurait *compétition* entre la mitochondrie et le GLP pour métaboliser l'isocitrate (schéma 5). La dérégulation d'un enzyme à forte affinité permettrait le fonctionnement du cycle de Krebs en dépit de l'importante sortie d'isocitrate fournissant un substrat au cycle glyoxylique. Le malate produit par la malate synthétase pourrait

alors contrôler l'exportation d'isocitrate vers les GLP, à condition toutefois que l'hypothèse de l'inhibition du transport de l'isocitrate par le malate soit confirmée.

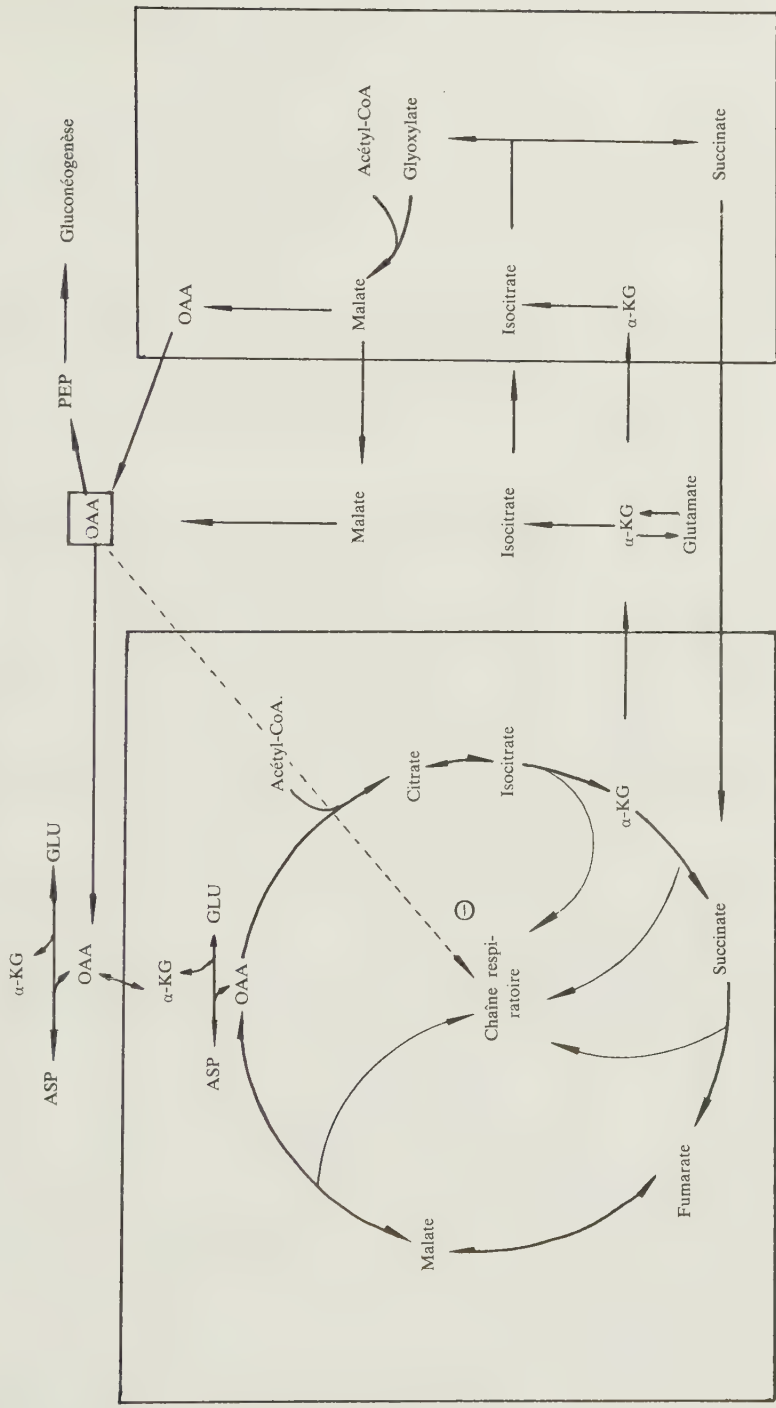
Nous avons en plus relevé deux faits intervenant probablement pour intégrer l'activité mitochondriale aux besoins de la cellule :

1) L'oxalacétate semble jouer un rôle central dans la régulation métabolique et énergétique ; sa concentration, dépendante de l'activité réversible du complexe bi-enzymatique malate déshydrogénase - aspartate aminotransférase pourrait contrôler l'état redox des pyridine nucléotides, de même que la balance entre la formation de citrate et la synthèse des acides aminés.

2) La mitochondrie pourrait contrôler directement le rapport NADH/NAD intracellulaire, sans l'intervention d'un « shuttle » par un autre équivalent réducteur. D'une part en effet, les mitochondries de *Neurospora* sont capables d'oxyder le NADH et le NADPH exogènes ou produits ailleurs dans la cellule. D'autre part, un pouvoir réducteur issu de l'oxydation intramitochondriale d' α -cétoglutarate semble franchir la membrane interne et réduire le NAD situé dans l'espace intermembranaire ; la mitochondrie pourrait ainsi fournir au cytosol les coenzymes réduits nécessaires à l'anabolisme.

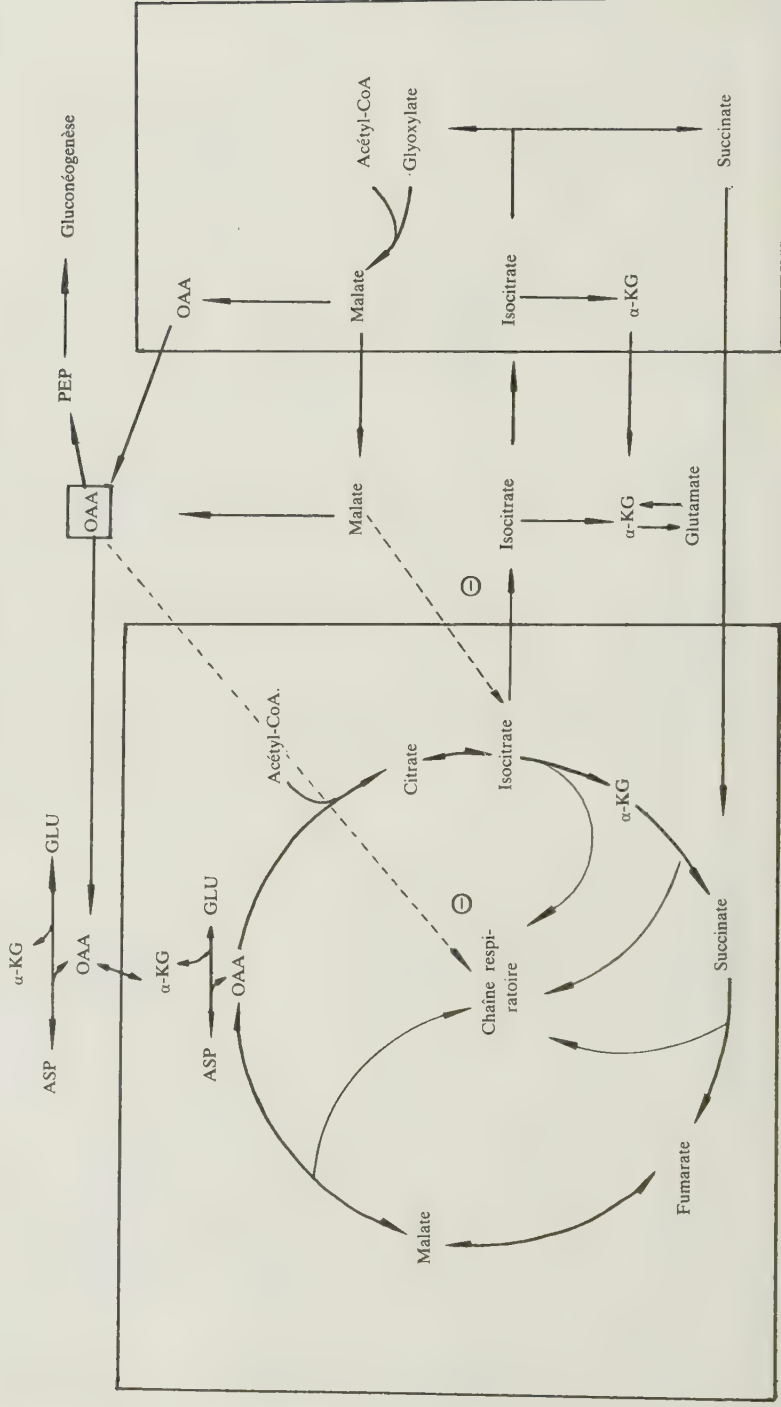
Compartimentation des voies métaboliques chez Neurospora

Hypothèse 1 : la mitochondrie exporte de l' α -cétoglutarate



Compartimentation des voies métaboliques chez Neurospora

Hypothèse 2 : la mitochondrie exporte de l'isocitrate



BIBLIOGRAPHIE

- ACKRELL, B.A. et al. - 1974 ; J. Biol. Chem. 249 : 2021.
- BUSCH, H. et al. - 1952 ; J. Biol. Chem. 196 : 717.
- CHANCE, B. and G.R. WILLIAMS - 1956 ; Adv. in Enzym. 17 : 65.
- CHAPPELL, J.B. - 1969 in « *Inhibitors Tools in Cell Research* », p. 335.
- DAY, D.A. and J.T. WISKICH - 1974 ; Plant Physiol. 53 : 104.
- DIXON, M. - 1943 in « *Manometric Techniques* » (Umbreit).
- DOUCE, R. and W.D. BONNER Jr. - 1972 ; BBRC 47 : 619.
- FLAVELL, R.B. and J.R.S. FINCHAM - 1968 ; J. Bact. 95 : 1063.
- HALL, D.O. and J.W. GREENAWALT - 1967 ; J. gen. Microbiol. 48 : 419.
- HARRIS, E.J. and J.R. MANGER - 1968 ; Biochem. J. 109 : 239.
- HUNTER, E. Jr. and E.E. SMITH - 1967 ; Meth. in Enzym. 10 : 689.
- KOBR, M.J. et al. - 1965 ; Arch. für Mikrobiol. 52 : 169.
- KOBR, M.J. and G. TURIAN - 1967 ; Arch. für Mikrobiol. 57 : 271.
- KOBR, M.J. et al. - 1973 ; Experientia 29 : 775.
- KORNBERG, A. - 1955 ; Meth. in Enzym. 1 : 707.
- KORNBERG, H.L. - 1966 ; Essays in Biochem. 2 : 1.
- LAMBOWITZ, A.M. et al. 1972 ; J. Biol. Chem. 247 : 4859.
- LAMPRECHT, W. and I. TRAUTSCHOLD - 1974 in « *Methods of Enzymatic Analysis* » (Bergmeyer) 4 : 2101.
- LOWRY, O.H. et al. - 1951 ; J. Biol. Chem. 193 : 265.
- MUNKRES, K.D. - 1970 ; BBA 220 : 149.
- PATTERSON, M.S. and R.C. GREENE - 1965 ; Anal. Chem. 37 : 854.
- ROBINSON, B.H. et al. - 1971 ; J. Biol. Chem. 246 : 5280.
- SCHWITZGUÉBEL, J.P. and M.J. KOBR - 1974 ; Experientia 30 : 709.
- TURIAN, G. - 1961 ; C.R. Acad. Sci. 252 : 1374.
- TURIAN, G. - 1963 ; Path. et Microbiol. 26 : 553.
- VOGEL, H.J. - 1956 ; Microbiol. Genet. Bull. 13 : 42.
- VON JAGOW, G. and M. KLINGENBERG - 1970 ; Eur. J. Biochem. 12 : 583.
- WEISS, H. et al. - 1970 ; Eur. J. Biochem. 14 : 75.

TABLE DES MATIÈRES

I. INTRODUCTION	5
But du travail	6
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	7
1) Souche utilisée	7
2) Milieux de culture	7
3) Culture et récolte du mycélium	7
4) Préparation de l'extrait mitochondrial	7
5) Mesure de la consommation d'oxygène	8
6) Détermination du rapport P/O	8
7) Dosage des protéines	8
8) Incubation avec des substrats radioactifs	8
9) Séparation des intermédiaires du cycle de Krebs et de métabolites dérivés	10
III. RÉSULTATS ET DISCUSSION	12
1) Comparaison entre des mitochondries de type saccharose et de type acétate	12
2) Influence du L-malate sur les taux d'oxydation	14
3) Influence de l'oxalacétate sur la respiration	17
4) Respiration du NADH et du NADPH exogènes	20
5) Effet du NAD exogène sur les taux d'oxydation	20
IV. CONCLUSIONS	25
BIBLIOGRAPHIE	29

Achévé d'imprimer
sur les presses de l'Imprimerie Roulet et Cie,
Carouge-Genève
en février mil neuf cent septante-sept

